

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(11) **037430**

(13) **B1**

(12) **ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ**

(45) Дата публикации и выдачи патента
2021.03.26

(51) Int. Cl. *A61K 38/08* (2019.01)
A61P 31/12 (2006.01)

(21) Номер заявки
201900025

(22) Дата подачи заявки
2019.01.18

(54) **ПРОТИВОВИРУСНОЕ ИММУНОТРОПНОЕ СРЕДСТВО ДЛЯ ЛЕЧЕНИЯ ОРВИ**

(31) **2018114273**

(56) US-A-2465805
UA-U-36558
WO-A1-8902745

(32) **2018.04.18**

(33) **RU**

(43) **2019.10.31**

(71)(73) Заявитель и патентовладелец:
ПИВИПИ ЛАБС ПТЕ. ЛТД (SG)

(72) Изобретатель:
**Черторижский Евгений
Александрович, Овчинников Михаил
Владимирович, Клейменов Алексей
Викторович (RU)**

(74) Представитель:
Гольшко Н.Т. (RU)

(57) Изобретение относится к медицине, в частности фармакологии, и касается применения назальной композиции, содержащей гексапептид тирозил-D-аланил-глицил-фенилаланил-лейцил-аргинина или его фармацевтически приемлемую соль для лечения острых респираторных вирусных заболеваний (ОРВИ), в частности, вызываемых вирусом гриппа. Заявлено применение назальной композиции, содержащей гексапептид тирозил-D-аланил-глицил-фенилаланил-лейцил-аргинина или его фармацевтически приемлемую соль для лечения острых респираторных вирусных заболеваний ОРВИ.

B1

037430

037430

B1

Область техники

Изобретение относится к медицине, в частности фармакологии, и касается применения назальной композиции, содержащей гексапептид тирозил-D-аланил-глицил-фенилаланил-лейцил-аргинина или его фармацевтически приемлемую соль, для лечения острых респираторных вирусных заболеваний (ОРВИ), в частности, вызываемых вирусом гриппа.

Уровень техники

В настоящее время наибольшую распространенность занимают острые респираторные вирусные инфекции (ОРВИ), на долю которых приходится более 90% всех инфекционных заболеваний [1]. По данным Всемирной организации здравоохранения, ежегодно в мире регистрируется более 40 млн заболевших. Социальное бремя ОРВИ характеризуется прежде всего высокими косвенными затратами, такими как затраты за период отсутствия на рабочем месте, экономические потери от снижения производительности труда, стоимость времени отсутствия на рабочем месте членов семьи, ухаживающих за больным (в США экономические потери, обусловленные только временной нетрудоспособностью, оцениваются в 232 млн долл.) [2].

Чрезвычайную актуальность эта проблема имеет и для России, так как, по официальным данным, в России каждый год регистрируется от 27,3 до 41,2 млн случаев респираторных инфекций. Именно на это заболевание, имеющее высокий удельный вес в структуре общей заболеваемости, приходится почти 40% дней нетрудоспособности [3].

В настоящее время известно более 200 вирусов, вызывающих гриппоподобные заболевания. В результате анализа данных целой серии исследований этиологической структуры ОРВИ, проведенных в разных странах разными группами ученых, установлено, что к наиболее распространенным возбудителям относятся риновирусы, вирусы гриппа, парагриппа, респираторно-синцитиальный вирус (РСВ), метапневмовирусы, бокавирусы и аденовирусы [4]. Вирусы гриппа относятся к ортомиксовирусам, имеют сферическую форму. Внутренняя часть вируса состоит из полимеразного комплекса (РА, РВ1, РВ2), рибонуклеопротеида и матричного протеина. Снаружи вирус покрыт оболочкой с двумя видами поверхностных антигенов - гемагглютинин (НА) и нейраминидаза (НА). За счет этих образований происходит прикрепление и внедрение вируса внутрь клетки хозяина. Поверхностные антигены обладают способностью к изменчивости, что обуславливает появление новых штаммов вирусов гриппа. Наибольшей вариабельностью обладают вирусы гриппа типа А, способные вызывать в короткие сроки эпидемии в масштабах отдельных стран или пандемии гриппа, охватывающие целые континенты. По данным Центра по контролю и профилактике заболеваний США (CDC), сезонные эпидемии гриппа приводят к 200 тыс. госпитализаций в год, а смертность от заболевания составляет 1,4-1,67 на 100 тыс. населения [5]. Пандемия гриппа, начавшаяся в 2009 г., была вызвана вирусом гриппа А (H1N1), обладающим пандемическим потенциалом. В Россию этот вирус пришел позже, и наибольшее число заболевших регистрировалось в 2010-2011, 2015 гг. [6]. Выборочные фармакоэпидемиологические исследования, проведенные среди 1462 пациентов, показали, что 84,7% заболевших были лица 18-19 лет [7].

Таким образом, недопущение распространения данной группы заболеваний является важной задачей, стоящей перед любой страной.

Соответственно, существует несколько методов лечения и профилактики данной группы заболеваний.

В частности, основной профилактической мерой по предотвращению развития эпидемий является массовая вакцинация населения. Вакцины разрабатываются ежегодно с учетом эпидемиологических данных о циркуляции штамма вируса на данной территории. Однако антигенный дрейф вируса гриппа может произойти уже после создания вакцины на текущий год. В последние годы очень часто встречаются ОРВИ, вызванные несколькими разными возбудителями. По некоторым данным, такие случаи встречаются у 70% заболевших. От больного может выделяться одновременно несколько вирусов, или вирус в сочетании с бактериями, или другие ассоциации. Отмечаются случаи, в которых инфекционное заболевание может быть вызвано одним вирусом, в процессе течения инфекции присоединяется другой вирус, что может привести к более тяжелому клиническому течению болезни. Такие микст-инфекции часто ухудшают самочувствие больного, увеличивают сроки болезни, могут обострять имеющиеся хронические заболевания или способствуют развитию вторичных осложнений [8].

Кроме того, для лечения респираторных вирусных заболеваний используются и противовирусные препараты, в частности, представляющие собой пептиды, обладающие противовирусным действием. Например, антимикробные пептиды (АМП) - это собственно молекулы иммунной защиты, которые, вероятно, производятся всеми многоклеточными растениями и животными. Они представляют собой первую линию врожденной иммунной системы, которая быстро уничтожает инвазивные патогены на ранней стадии инфекции и также может вызывать системную адаптивную иммунную реакцию. Большинство АМП представляют собой амфипатические и катионные молекулы, обладающие способностью связываться с мембранами микробов, которые, как правило, имеют отрицательный заряд. Сотни АМП идентифицированы и классифицированы в соответствии с их структурными особенностями и/или составом аминокислот. Два семейства АМП у позвоночных, кателицидины и дефензины, это небольшие молекулы, которые в основном производятся лейкоцитами и клетками эпителия.

Из уровня техники известна композиция, содержащая такой класс пептидов, где пептид способен подавлять различные респираторные вирусные инфекции. Благодаря функциональной области, способной связываться с поверхностным гликопротеином респираторного вируса, пептид может связываться с поверхностным гликопротеином вируса и далее доставляться в эндосомы клеток посредством эндоцитоза. Поскольку пептид богат основными аминокислотами, он способен препятствовать снижению pH в поздних эндосомах, блокируя, таким образом, слияние мембран вируса и эндосомы и последующий распад вируса с выработкой вирусной РНК. Таким образом, пептид демонстрирует сильную способность блокировать инфекции респираторных вирусов, таких как различные подтипы вирусов гриппа и коронавируса, и его можно использовать для блокирования инфекций респираторных вирусов в клетках-мишенях, а также для профилактики или лечения инфекций респираторных вирусов (патент RU 2639559, 21.12.2017).

Однако использованию таких препаратов, как указывалось ранее, препятствует изменчивость генетического материала вирусов, и, как следствие, их действие ограничено конкретным возбудителем, откликнувшимся на данный вид терапии.

Также используется и лечение комбинированными препаратами. Например, в повседневной практике с целью симптоматического лечения ОРВИ адекватным представляется использование комбинированных препаратов, обладающих жаропонижающим, обезболивающим, противоотечным и ангиопротекторным эффектами. Применение комбинированных симптоматических ЛС сопровождается меньшим числом нежелательных явлений, чем использование набора монокомпонентных препаратов, и экономически более целесообразно [9].

Однако использование такой группы препаратов не учитывают важную роль сохранения функции носового дыхания и факторов местного специфического и неспецифического иммунитета при поражении пациентов ОРВИ.

В то же время одной из причин поражения ОРВИ является изменение в работе функций носового дыхания, которая связана в том числе и с работой механизмов обеззараживания поступающего воздуха. Данная функция осуществляется за счет выработки слизистой оболочкой полости носа факторов неспецифической и специфической иммунологической защиты, а также мукоцилиарного клиренса.

Профилактический и лечебный эффект таких средств напрямую зависит от способности средства удалять из полости носа агрессивные органические и неорганические факторы вдыхаемого атмосферного воздуха и нормализовать неспецифическую и специфическую иммунологическую защиту, а также работу мукоцилиарного клиренса.

Перспективным направлением такой профилактики является использование средств для активизации неспецифической резистентности организма. С этой целью в российской клинической практике широко используются индукторы эндогенных интерферонов - Тилорон, Арбидол, Циклоферон.

Из литературы известен дипептида-глутамил-триптофан в форме натриевой соли (патент РФ 2107691 от 1998 г.). Пептид применяется в качестве иммуномодулирующего средства, оказывающего влияние на реакции клеточного, гуморального иммунитета и неспецифическую резистентность организма. Стимулирует процессы регенерации в случае их угнетения, улучшает течение процессов клеточного метаболизма. Усиливает процессы дифференцировки лимфоидных клеток, обладает способностью стимулировать колониобразующую активность клеток костного мозга, индуцирует экспрессию дифференцировочных рецепторов на лимфоцитах, нормализует количество Т-хелперов, Т-супрессоров и их соотношение у больных с различными иммунодефицитными состояниями.

Данный дипептид был использован в композиции для назального применения, которая применяется для профилактики и/или лечения заболеваний верхних дыхательных путей, в частности острых респираторных вирусных инфекций (ОРВИ), например гриппа. Композиция содержит активные и вспомогательные вещества, в качестве активных веществ использованы морская соль и альфа-глутамил-триптофан при следующем соотношении активных веществ (мас.%):

морская соль - 95,00-98,00;

альфа-глутамил-триптофан - 2,00-5,00

(патент RU 2540496, 10.02.2015, прототип).

Такое назальное лекарственное средство содержит ингредиенты морской воды и обеспечивает активный лаваж полости носа: способствует удалению слизи, уменьшению инфицированных выделений и отека слизистой носа, размягчению и удалению корок. Препарат нормализует защитную функцию реснитчатого эпителия слизистой носа и улучшает носовое дыхание.

Однако использование морской соли в качестве дополнительного компонента не самым лучшим образом сказывается на активности используемого дипептида и ведет к потере его стабильности и активности. В силу этого, несмотря на то, что в спецификации патента отмечается общее известное иммуномодулирующее свойство применяемого пептида, в нем не отражены прямые результаты исследований, а также сравнения его по эффективности с действующими противовирусными препаратами, что не дает возможность оценить противовирусный механизм действия описываемого препарата, его противовирусную эффективность и избирательность.

Указанные недостатки диктуют необходимость в разработке новых средств на основе пептидов, ко-

торые обладают выраженным противовирусным действием и запускают в организме механизмы, противодействующие развитию ОРВИ.

В частности, из уровня техники известен гексапептид тирозил-D-аланил-глицил-фенилаланил-лейцил-аргинин (обозначен как Даларгин), который представляет собой синтетический структурный аналог эндогенного опиоидного регуляторного пентапептида лейцин-энкефалина ($H_2N-Tyr-Gly-Gly-Phe-Leu-COOH$, мол. масса 555,6 а.е.м.).

Даларгин обладает неспецифическим сродством к μ (мю), δ (дельта) и κ (каппа) опиоидным рецепторам, что объясняет широкий спектр биологической активности: обезболивающие [9] и антиоксидантные [10] свойства. В качестве средства, снижающего кислотность желудочного сока и внешнюю секреторную активность поджелудочной железы, препарат зарегистрирован на территории РФ (База данных ГРЛС: <https://grls.rosminzdrav.ru>). Также известны гипотензивное и положительное хронотропное действие вещества [11].

В настоящее время зарегистрировано несколько десятков патентов, демонстрирующих различные эффекты Даларгина. Так, патент RU 2196603 раскрывает применение Даларгина для лечения ожоговой болезни в составе инфузионной терапии. Патенты UA 6829LJ, UA 6823U и UA 6826U раскрывают применение Даларгина для лечения острого экспериментального панкреатита. Применение Даларгина в качестве антистрессорного агента освещалось в патентах UA 67632, UA 67630 и UA 67629 на экспериментальных моделях хронического панкреатита, острого аднексита и перитонита соответственно. Антистрессорная активность Даларгина была показана в патенте UA 67626 в модели экспериментального хронического стресса. Патент RU 2180598 раскрывает применение Даларгина для лечения токсического гепатита у пациентов с хронической наркоманией. Публикация MD1413F раскрывает применение Даларгина для лечения слизистой оболочки полости рта и красного плоского лишая, а публикация MD1296F предоставила данные по терапии Даларгином плоского лишая. В заявке RU 2008131509 представлена фармацевтическая композиция для терапии демиелинизирующих заболеваний, которая включала Даларгин. Патент RU 2218896 раскрывает применение Даларгина для лечения буллезной кератопатии. Публикации MD1963F и MD1610F освещают применение Даларгина при хроническом рецидивирующем афтозном стоматите, а патент RU 2230549 - для терапии аллергических дерматозов. Кроме того, эффективность Даларгина в терапии некоторых вирусных заболеваний была продемонстрирована в патентах RU 2261722 (лечение скрытой формы генитального герпеса у женщины с синдромом потери плода) и RU 2167671 (терапия клещевого энцефалита). Однако перечисленные работы не освещают терапию ОРВИ и имеют отношение к лечению других заболеваний. Кроме того, в них отсутствует указание на прямой противовирусный эффект исследуемого гексапептида.

При этом, несмотря на то, что патент RU 2241488 описывает применение Даларгина в виде раствора для инъекций, а заявка RU 2010152024 - в виде спрея для интраназальной фармацевтической композиции, в этих работах Даларгин предполагался для лечения гастроэнтерологических заболеваний.

Ранее было показано увеличение продукции интерферона- α (ИФН- α) через 24 и 48 ч после подкожного введения лейцин-энкефалина в дозе 10 мг/кг [12], однако данный эффект для Даларгина ранее не изучался. В настоящее время имеется достаточное количество исследований, подтверждающих наличие у Даларгина иммуномодулирующего действия [9, 13-16]. Однако в опубликованных работах не освещается полный спектр иммуномодулирующей активности Даларгина, в частности влияние на продукцию цитокинов, активность естественных киллеров, интерферон-индуцирующее действие или фагоцитоз. Фактически, в данных работах не продемонстрировано наличие повышения местного иммунитета при действии гексапептида.

Резюмируя вышеизложенное, можно утверждать, что опубликованные в настоящее время материалы не касаются собственно противовирусного действия Даларгина, не раскрывают в полном объеме его иммуномодулирующие качества, а также не освещают актуальность применения этого препарата в терапии ОРВИ.

Раскрытие сущности изобретения.

В то же время проведенные авторами изобретения исследования показали, что эффекты Даларгина, а именно прямой противовирусный эффект, возможность повышать факторы местной и системной иммунологической защиты, при местном введении через нос, позволяют использовать его как в виде монотерапии, так и в сочетании с другими лекарственными средствами в качестве средства для лечения и профилактики ОРВИ, в частности гриппа.

Полученные результаты позволили разработать и предложить к применению назальную лекарственную композицию, содержащую гексапептид тирозил-D-аланил-глицил-фенилаланил-лейцил-аргинина или его фармацевтически приемлемую соль для лечения острых респираторных вирусных заболеваний (ОРВИ), в частности, вызываемых вирусом гриппа.

В частном случае осуществления изобретения таким заболеванием является грипп.

В частном случае осуществления изобретения фармацевтически приемлемой солью является тирозил-D-аланил-глицил-фенилаланил-лейцил-аргинина диацетат.

В частном случае назальная композиция изготовлена в виде спрея, содержащего в качестве актив-

ного вещества гексапептид тирозил-D-аланил-глицил-фенилаланил-лейцил-аргинина или его фармацевтически приемлемую соль 0,01-3 мас.% и вспомогательные вещества - остальное.

В частном случае осуществления изобретения композиция характеризуется тем, что она содержит гексапептид тирозил-D-аланил-глицил-фенилаланил-лейцил-аргинина или его фармацевтически приемлемую соль и вспомогательные вещества при следующем соотношении компонентов, мас.%:

гексапептид - 0,01-3,
натрия хлорид - 7-11,
вода - остальное.

В частном случае осуществления изобретения композиция характеризуется тем, что она содержит гексапептид тирозил-D-аланил-глицил-фенилаланил-лейцил-аргинина или его фармацевтически приемлемую соль и вспомогательные вещества при следующем соотношении компонентов, мас.%:

гексапептид - 0,01-3,
вода - остальное.

В частном случае осуществления изобретения композиция характеризуется тем, что она содержит гексапептид тирозил-D-аланил-глицил-фенилаланил-лейцил-аргинина или его фармацевтически приемлемую соль и вспомогательные вещества при следующем соотношении компонентов, мас.%:

гексапептид - 0,01-3,
натрия хлорид - 7-11,
бензалкония хлорид - 0,1-0,2,
вода - остальное.

В частном случае осуществления изобретения композиция характеризуется тем, что она содержит в качестве вспомогательных веществ натрия хлорид и воду при следующем соотношении компонентов, мас.%:

натрия хлорид - 9,
вода - 90.

В частном случае осуществления изобретения композиция характеризуется тем, что она содержит в качестве воды воду для инъекций.

В частном случае осуществления изобретения композиция характеризуется тем, что она содержит в качестве воды очищенную воду.

Техническими результатами заявляемого изобретения является:

расширение арсенала технических средств по созданию назальной композиции для лечения ОРВИ; создание средств, применение которых способно удалять из полости носа органические и неорганические факторы вдыхаемого атмосферного воздуха и нормализовать неспецифическую и специфическую иммунологическую защиту;

создание средства на основе пептида, способного оказывать прямое противовирусное действие на возбудителей ОРВИ, находящихся в организме и в воротах инфекции.

Таким образом, новизна и суть настоящего изобретения заключается в разработке средства, в котором продемонстрировано собственное противовирусное действие Даларгина в отношении основных возбудителей ОРВИ - вирусов гриппа и аденовирусов, а также в полном объеме раскрытие иммуномодулирующего компонента активности Даларгина в терапии этих заболеваний.

Краткое описание чертежей

Фиг. 1. Концентрация ИФН- α в сыворотке крови мышей после введения Даларгина, Арбидола и плацебо.

Фиг. 2. Влияние Даларгина на цитотоксическую активность естественных киллеров.

Фиг. 3. Подавление синтеза провоспалительных цитокинов под влиянием Даларгина.

Осуществление изобретения

Ниже приведены примеры осуществления изобретения в частных случаях выполнения.

Пример 1. Получение Даларгина.

Способ получения Даларгина и его фармацевтически приемлемой соли описан ранее и осуществлялся классическим методом пептидного синтеза.

Описание метода синтеза Даларгина представлено ниже.

Синтез H-Phe-Leu-Arg.

750 г Z-Leu-ONSu растворить в 3 л DMF, к полученному раствору добавить 368 г Arg, перемешивать сутки. DMF упарить на роторном испарителе при 41°C в вакууме масляного насоса. Полученное масло растворить в 15 л бутанола, перенести в стеклянный экстрактор, оборудованный мешалкой. Добавить в экстрактор 10 л дистиллированной воды. Перемешивать 5 мин до полного разделения слоев (10-24 ч). Воду слить в чистую канистру. Органический слой промыть еще 3 раза по 3 л дистиллированной водой. Водный слой и водные промывки объединить и дополнительно экстрагировать 4 л бутанола. Бутанол упарить на роторном испарителе при 43°C в вакууме мембранного насоса.

Полученное масло Z-Leu-Arg растворить в 3 л этилового спирта. Перенести раствор в реактор гидрирования. Добавить 50 г Pd/C суспендированного в 1,5 л воды. Перед гидрированием реактор продувать азотом. Нагнетаем водород до 2 кгс/см² и включаем циркуляционный насос, поддерживаем температуру

не выше 43°C. Отфильтровать катализатор, реактор промыть 2 л дистиллированной воды, затем этой же водой промыть катализатор на фильтре. Фильтрат упарить на роторном испарителе при 43°C в вакууме мембранного насоса.

Полученное масло H-Leu-Arg растворить в 3 л DMF и 1 л отгоняем на роторном испарителе при 41°C в вакууме масляного насоса. К полученному раствору добавить раствор 785 г Z-Phe-ONSu в 2 л DMF, перемешивать 24 ч. DMF упарить на роторном испарителе при 41°C в вакууме масляного насоса. Полученное масло растворить в 15 л бутанола, перенести в стеклянный экстрактор, оборудованный мешалкой. Добавить в экстрактор 10 л дистиллированной воды. Перемешивать 5 мин. Органический слой промыть еще 3 раза по 3 л дистиллированной воды. Водный слой и водные промывки объединить и дополнительно экстрагировать 4 л бутанола. Бутанол объединить и упарить на роторном испарителе при 43°C в вакууме мембранного насоса.

Полученное масло Z-Phe-Leu-Arg растворить в 3 л этилового спирта, так чтобы объём раствора стал 6 л. Перенести раствор в реактор гидрирования. Добавляем 50 г палладия на угле суспендированного в 1,5 л воды. Перед гидрированием реактор продуть азотом. Нагнетаем водород до 2 кгс/см² и включаем циркуляционный насос. За счёт циркуляции идёт разогрев, поддерживаем температуру не выше 43°C. Отфильтровать катализатор, реактор промыть 2 л дистиллированной воды, затем этой же водой промываем катализатор на фильтре. Фильтрат упарить на роторном испарителе при 43°C в вакууме мембранного насоса. Полученный H-Phe-Leu-Arg растворить в 3 л DMF (примерно 0,6 моль на 1 кг раствора), далее используем раствор при сшивке белка.

Синтез Вос-Туг(Вос)-Ala-Gly-ONP.

907 г H-Gly(OBzl)*Tos растворить в 3 л DMF, довести pH 7,2-7,5 N-метилморфолином. При охлаждении на водяной бане добавить раствор 773 г Вос-Ala-ONSu в 2 л DMF одной порцией; T≤25°C. Убрать баню и перемешивать при комнатной температуре. ТСХ контроль. DMF отогнать на роторном испарителе при 41°C в вакууме масляного насоса. Полученное масло растворить в 15 л этилацетата, перенести в стеклянный экстрактор, оборудованный мешалкой. Промыть органический слой 3 раза по 3 л воды. 200 мл насыщенного раствора Na₂CO₃ доводим до 3 л водой, промыть этим раствором органический слой, затем промыть ещё 3 раза по 3 л воды. Приготовить раствор 6,5 мл 20% серной кислоты в 3 л воды, промыть органический слой этим раствором, затем промыть ещё 3 раза по 3 л воды. При каждой отмывке добавить 0,5 л этилацетата. Этилацетат упарить на роторном испарителе при 41°C в вакууме мембранного насоса.

Полученный Вос-Ala-Gly(OBzl), при охлаждении на ледяной бане и интенсивном перемешивании, растворить в 3,4 кг охлаждённой до 5°C трифторуксусной кислоте. После полного растворения баню убирать и перемешивать ещё в течение 1,5 ч при комнатной температуре. Отогнать ТФУ на роторном испарителе при 41°C в вакууме мембранного насоса. Затем 3 раза соупарить с 0,5 л бензола.

Полученное масло H-Ala-Gly(OBzl) при охлаждении на водяной бане растворить в 2,5 л DMF, довести pH до 7,2-7,4. Добавить раствор 1183 г Вос₂-Туг-ONSu в 2 л DMF, T≤25°C. Убирать баню и перемешивать при комнатной температуре 12 ч. ТСХ контроль. DMF отогнать на роторном испарителе при 41°C в вакууме масляного насоса. Полученное масло растворить в 15 л этилацетата, перенести в стеклянный экстрактор, оборудованный мешалкой. Промыть органический слой 3 раза по 3 л воды. 200 мл насыщенного раствора Na₂CO₃ довести до 3 л водой, промыть раствором органический слой, затем промыть ещё 3 раза по 3 л воды. Приготовить раствор 7,5 мл 20% серной кислоты в 3 л воды, промыть органический, затем промыть ещё 3 раза по 3 л воды. Этилацетат упарить на роторном испарителе при 41°C. Масло растворить в 2,6 л горячего изопропилового спирта и порциями, примерно за 1 ч, добавить 7,5 л гексана, перемешивать до выпадения осадка. Выпавший Вос₂-Туг-Ala-Gly(OBzl) отфильтровать, промыть 2 раза по 5 л смеси гексан/ИПС (4,2/0,8). Сушить на воздухе. Выход 1300 г.

Полученный Вос₂-Туг-Ala-Gly(OBzl) растворить в 5 л этилового спирта, так чтобы объём раствора стал 6 л. Перенести раствор в реактор гидрирования. Добавить 50 г палладия на угле суспендированного в 1,5 л воды. Перед гидрированием реактор продуть азотом. Нагнетаем водород до 2 кгс/см² и включаем циркуляционный насос. За счёт циркуляции идёт разогрев, поддерживать температуру не выше 43°C. Через 3 ч ТСХ контроль. Отфильтровать катализатор, фильтрат упарить на роторном испарителе при 41°C в вакууме мембранного насоса. Растворить в 2 л DMF, 1 л отогнать на роторном испарителе при 41°C в вакууме масляного насоса. Добавить 1 л DMF и 3,5 л этилацетата, затем добавить раствор 310 г нитрофенола в 0,5 л этилацетата и 0,3 л DMF. Охладить до -18°C. Приготовить раствор 470 г DCC в 0,8 л этилацетата и 0,4 л DMF. Охладить до -18°C. После термостатирования оба раствора смешивают и оставляют на сутки при комнатной температуре. Выпавшую мочевину отфильтровывать, промыть 2 раза по 2 л этилацетата. Фильтрат упарить на роторном испарителе в вакууме мембранного насоса, затем масляного при 41°C. Полученное масло кристаллизуют из горячего изопропанола и гексана в следующем соотношении; на 0,6 моль Вос₂-Туг-Ala-Gly-ONP берут 0,8 л изопропанола и 0,4 л гексана перемешивают до выпадения осадка. Выпавший осадок Вос₂-Туг-Ala-Gly-ONP отфильтровать, промыть 2 раза по 5 л смеси гексан/изопропанол (1/2). Выход 1170 г.

Растворить 530 г Вос₂-Туг-Ala-Gly-ONP в 1,2 л DMF и при охлаждении на водяной бане добавить

его к расчётному количеству раствора H-Phe-Leu-Arg (1/1). Перемешивать 2 ч. DMF упарить на роторном испарителе при 41°C в вакууме масляного насоса. Масло растворить в 3,2 л горячего изопропанола и порциями при перемешивании добавить 4,5 л горячего гексана. Когда раствор остынет примерно до 40-45°C, добавить 110 г ледяной уксусной кислоты. Перемешивать 2 ч. Выпавший Boc₂-Tyr-Ala-Gly-Phe-Leu-Arg отфильтровать, промыть 2 раза по 1,5 л смеси гексан/изопропанол (2/1). Сушить на воздухе. Выход 700 г.

Синтез Даларгина.

100 г Boc₂-Tyr-Ala-Gly-Phe-Leu-Arg растворить в 180 мл ТФУ при охлаждении на ледяной бане. Перемешивать 1 ч после полного растворения. ТФУ упарить на роторном испарителе в вакууме мембранного насоса при 41°C. Остаток затираем из 1,5 л диэтилового эфира, отфильтровываем, промываем 3 раза эфиром. Сушим в вакууме мембранного насоса при 35°C 6 ч. Выход 95 г.

Пример 2. Приготовление назальной композиции гексапептида.

Производство даларгин-содержащей композиции в виде спрея включает приготовление раствора Даларгина, заполнение флаконов.

Для приготовления назальной композиции в 50 мл воды для инъекций температурой от 20-25°C добавляют при перемешивании от 0,01 до 3 г гексапептида (в зависимости от состава раствора). Затем полученный объем раствора доводят водой для инъекций до 100 мл. Полученный раствор стерилизуют методом мембранной фильтрации в асептических условиях, пропуская через фильтр с диаметром пор 0,22 мкм, разливают в полимерные или стеклянные флаконы в атмосфере инертного газа, осуществляют укупорку флаконов с готовой продукцией.

Также в процессе приготовления композиции можно дополнительно добавить хлорид натрия. Для этого в 50 мл воды для инъекций температурой от 20-25°C растворяют при перемешивании от 7 до 11 г хлорида натрия (в зависимости от состава раствора). Затем добавляют при перемешивании от 0,01 до 3 г гексапептида (в зависимости от состава раствора). Затем полученный объем раствора доводят водой для инъекций до 100 мл. Полученный раствор стерилизуют методом мембранной фильтрации в асептических условиях, пропуская через фильтр с диаметром пор 0,22 мкм, разливают в полимерные или стеклянные флаконы в атмосфере инертного газа, осуществляют укупорку флаконов с готовой продукцией.

Кроме того, в процессе приготовления композиции можно дополнительно добавить бензалкония хлорид. Для этого в 50 мл очищенной воды с температурой от 20-25°C растворяют при перемешивании от 7 до 11 г хлорида натрия (в зависимости от состава раствора) и от 0,1-0,2 г бензалкония хлорида. Затем добавляют при перемешивании от 0,01 до 3 г гексапептида (в зависимости от состава раствора). Затем полученный объем раствора доводят очищенной водой до 100 мл. Полученный раствор стерилизуют методом мембранной фильтрации в асептических условиях, пропуская через фильтр с диаметром пор 0,22 мкм, разливают в полимерные или стеклянные флаконы в атмосфере инертного газа, осуществляют укупорку флаконов с готовой продукцией.

С помощью вышеприведенного способа получают композиции следующего состава.

Название	Содержание г/мл
Гексапептид (в виде фармацевтически приемлемой соли)	0,01-3
Вода для инъекций	до 100 мл

Название	Содержание г/мл
Гексапептид (в виде фармацевтически приемлемой соли)	0,01-3
Натрия хлорид	7-11
Вода для инъекций	до 100 мл

Название	Содержание г/мл
Гексапептид (в виде фармацевтически приемлемой соли)	0,01-3
Натрия хлорид	7-11
бензалкония хлорид	0,1-0,2
Вода очищенная	до 100 мл

Ниже приведем результаты экспериментов, подтверждающие эффективность Даларгина как противовирусного и иммуномодулирующего средства. Исследования, приведенные в этих примерах, были

спланированы и выполнены в соответствии с актуальными методическими рекомендациями, касающимися доклинической разработки противовирусных лекарственных средств, иммуномодулирующих препаратов и индукторов интерферонов [17].

Пример 3. Изучение *in vitro* противовирусной активности гексапептида в отношении эталонного штамма вируса гриппа А/Н1N1.

Выполнили сравнение с препаратом Арбидол на модели клеток культуры ткани MDCK с применением штаммов вирусов гриппа А/Новая Каледония/20/99 (H1N1).

С учетом 100% ингибирующего действия Арбидола (на репродукцию эпидемических штаммов вируса) в концентрации 10,0 мкг/мл эта концентрация в воде была выбрана для сравнения противовирусной активности препаратов в условиях одинаковой степени заражения вирусом гриппа А.

Кроме того, для каждого препарата рассчитывали концентрации, ингибирующие вирусную репродукцию на 50% (МИК₅₀).

Из данных, представленных в табл. 1, видно, что оба вещества обладают высокой противовирусной активностью в отношении штаммов вирусов гриппа А/Новая Каледония/20/99 (H1N1), причем гексапептид характеризуется более низкими значениями МИК в условиях крайне низкого содержания в растворе.

Таблица 1

Минимальная ингибирующая концентрация (МИК₅₀) и активность сравниваемых препаратов в отношении эталонного штамма вирусов гриппа А/Новая Каледония/20/99 (H1N1) в клетках культуры ткани MDCK

Препарат	Ингибирование вирусной репродукции	
	МИК ₅₀ мкг/мл	Активность при 10 мкг/мл (доля жизнеспособных клеток в %)
Арбидол	6,0	100
Даларгин	0,8	100

Пример 4. Изучение противовирусной эффективности Даларгина в отношении вируса гриппа А на модели пневмонии мышей.

Мыши (n=40, самки линии BALB, средний вес 18-22 г) инфицировались интраназально под легким эфирным наркозом вирусом гриппа А/Аичи/2/69 (H3N2). Заранее была определена доза вируса, содержащая 10 ЛД₅₀. Для этого группы, состоящие из 5-6 мышей, заражали цельным аллантоисным вирусом и последовательными 10-кратными его разведениями (от 10⁻¹ до 10⁻⁶) в объеме 50 мкл. Данные установили, что ЛД₅₀ составила разведение вируса 10⁻³. Далее все животные были заражены 10-кратной полуживой дозой вируса в 50 мкл.

В качестве активного контроля был выбран Арбидол. Случайным образом (методом рандомизации) были сформированы 4 группы животных (по 10 мышей в каждой):

- группа контроля (физ. раствор),
- группа, получавшая Арбидол,
- группа, получавшая Даларгин в/м,
- группа, получавшая Даларгин интраназально.

Схема получения Даларгина, Арбидола или плацебо: за 24 и 1 ч до инфицирования, далее каждые 24 ч после инфицирования в течение 5 дней. Даларгин вводили в суточной дозе 2 мг/кг в/м или интраназально. Арбидол вводили через внутрижелудочный зонд (пероральным путем).

Даларгин вводили в виде фармацевтической композиции, разведенной до необходимой концентрации, как в Примере 2, с использованием натрия хлорида и без него, с целью достижения рекомендованных объемов для внутримышечного (0,5 мл) или интраназального (0,01 мл) пути введения [18].

За лечеными и контрольными животными вели ежедневное наблюдение. Взвешивание мышей проводилось после инфицирования на 3-, 5- и 15-й дни.

Химиотерапевтическую активность соединений на модели гриппозной пневмонии мышей оценивали по двум критериям: 1) средняя продолжительность жизни и 2) динамика снижения веса (по сравнению с контрольной группой).

Средняя продолжительность жизни мышей высчитывалась по формуле: $MSD = \Sigma f \cdot (d-1) / n$ (где f - количество мышей, умерших на день d, выжившие мыши также включены в f и d в этом случае равно 15, n - количество мышей в группе).

Взвешивание мышей проводилось после инфицирования на 3-, 5- и 15-й дни. Уменьшение или увеличение веса рассчитывалось отдельно для каждой мыши и выражалось в процентах. При этом за 100% принимался вес животного перед инфицированием. Для всех мышей одной группы определялось среднее значение процента потери или увеличения веса.

В группе контроля животные больше всего теряли вес на 5-й день после инфицирования. В группах животных, получавших сравниваемые препараты, снижение веса было статистически значимо меньше по сравнению с обеими группами контроля. Группы, получавшие Арбидол или Даларгин, по динамике снижения потери веса значимо между собой не различались.

Средняя продолжительность мышей в группе контроля была наименьшей и составила 8,5 дней. Ле-

чение Арбидолом или Даларгином привело к увеличению средней продолжительности жизни животных, которая возросла до 11-14 дней. Однако терапия, предоставляя возможность увеличить долю выживших после инфицирования животных (по сравнению с плацебо), все же не позволила полностью предотвратить гибель животных (табл. 2).

Таблица 2
Противовирусная эффективность соединений на модели
гриппозной пневмонии у мышей

Группа	Выживаемость	Смертность (%)	Средняя продолжительность жизни
Даларгин (в/м 2 мг/кг/день, n=10)	9/10	10	14,0
Даларгин (интраназально 2 мг/кг/день, n=10)	8/10	20	12,5
Арбидол (перорально, 60 мг/кг/день, n=10)	7/10	30	11,2
Контроль (плацебо, n=10)	2/10	80	8,5

Приведенные данные свидетельствуют, что в/м или интраназальное введение Даларгина в дозе 2 мг/кг/день в течение 5 дней снижает смертность мышей от гриппозной пневмонии, увеличивая среднюю продолжительность жизни и уменьшая потерю веса по сравнению с плацебо. Даларгин показал большую эффективность по сравнению с Арбидолом как по увеличению средней продолжительности жизни, так и по увеличению выживаемости. Внутримышечное и интраназальное введение Даларгина показали сопоставимые результаты по антивирусной активности.

Пример 5. Экспериментальное изучение противовирусной эффективности Даларгина в отношении аденовирусной инфекции.

В работе использовали аденовирус 5-го типа, полученный в 1998 году из НИИ вирусологии им. Д.И. Ивановского и хранящийся в Специализированной коллекции филиала ФГУ "48 ЦНИИ Минобороны России - ВЦ".

Использовали типовую культуру HeLa (клетки карциномы шейки матки) с плотностью 200-250 тыс./мл. Использовали полусинтетические ростовые среды на основе раствора Хенкса с содержанием 7,5 и 2% сыворотки крупного рогатого скота соответственно. Двухсуточный монослой культуры клеток HeLa инфицировали аденовирусом 5-го типа в дозе 0,01 ЦПД₅₀ на клетку. Затем монослой культуры клеток инкубировали при 37±0,5°C в течение 96 ч.

Противовирусную эффективность препарата оценивали по подавлению цитопатогенного действия (ЦПД) вируса в культуре клеток HeLa при нанесении его на сформированный монослой культуры клеток HeLa.

Критериями эффективности исследуемого препарата являлись частота обнаружения ЦПД вируса и коэффициент ингибирования (Ки, %). Коэффициент ингибирования рассчитывали по формуле $K_i = 100 * (C_k - C_o) / C_k$ (где C_k и C_o - инфекционный титр вируса в контрольной и опытной пробе соответственно).

При внесении Даларгина за 24 ч до заражения монослоя клеток аденовирусом в дозе 0,01 ЦПД₅₀ на клетку в концентрациях 100, 20 и 10 мкг/мл препарат практически полностью защищал клетки от цитопатического действия вируса. В концентрации 10 мкг/мл защитная эффективность препарата составила 40,0%. При внесении Даларгина в поддерживающую среду за 24 ч до инфицирования защитная эффективность препарата увеличилась на 10-20% по сравнению с внесением через 2 ч после инфицирования.

Таким образом, введение Даларгина подавляло репродукцию аденовируса 5-го типа в монослойной культуре клеток HeLa, а полученные результаты подтверждают противовирусную эффективность этого препарата в отношении аденовирусной инфекции (табл. 3).

Таблица 3

Эффективность Даларгина в отношении аденовируса 5-го типа
в монослойной культуре клеток HeLa

Схема внесения препарата	Даларгин (доза, мкг/мл)	Частота обнаружения ЦПД	Подавление ЦПД (Ки, %)
За 24 ч до инфицирования	100,0	1/10	90,0
	20,0	4/10	60,0
	10,0	6/10	40,0
Через 2 ч после инфицирования	100,0	2/10	80,0
	20,0	5/10	50,0
	10,0	8/10	20,0
Контроль (без препарата)	-	10/10	-
Контроль среды	-	0/10	-

Пример 6. Изучение интерферон-индуцирующего влияния Даларгина у мышей.

При всех вирусных инфекциях продуцируются интерфероны (ИФН) в ходе ранней цитокиновой реакции. Они вызывают образование рибосомами ряда ферментов, ингибирующих транскрипцию и трансляцию вирусного генома, что приводит к угнетению репродукции вируса. Зараженные вирусами измененные клетки элиминируются при участии НК-клеток и цитотоксических лимфоцитов, при этом происходит индукция противовирусной защиты незараженных клеток под воздействием ИФН- α и ИФН- β . Поэтому поиск нетоксичных индукторов эндогенного интерферона, а также пути стимуляции его образования представляют большой интерес и являются актуальными для медицинской вирусологии [18, 19].

В качестве препарата сравнения был выбран противовирусный препарат с интерферон-индуцирующей активностью Арбидол.

Эксперименты выполнены на 40 мышках-самцах линии СВА х С57В1/6 массой тела 20-25 г. Животных рандомизировали на 4 группы (по 10 особей в каждой): две активные (получавшие Даларгин или Арбидол) и две группы контроля. Одна группа контроля предназначалась для определения исходного уровня ИФН (до начала эксперимента), другая - для определения уровня ИФН через 24 ч после введения плацебо (физ. раствор), что обеспечивало соблюдение однородности условий.

Животные находились в клетках в помещении со звукоизоляцией, с естественной сменой режима освещения, при температуре 20-22°C, пищу и воду получали *ad libitum*.

Даларгин вводили в/м в дозе 1 мг/кг, что эквивалентно дозе человека 5-6 мг.

Арбидол вводили внутривенно в виде предварительно приготовленной суспензии в 1%-ном крахмальном геле.

Статистический анализ включал применение поправки Бонферрони для множественных сравнений.

Содержание ИФН- α в сыворотке крови мышей измеряли через 24 ч после введения препаратов. Забор крови для количественного определения интерферонов производили из сердца под нембуталовым наркозом (60 мг/кг). Полученные образцы крови оставляли на 2 ч при комнатной температуре для свертывания, сыворотку крови отделяли центрифугированием, пулировали (2 мыши на пул), замораживали и хранили при температуре -20°C вплоть до проведения измерений. Для определения концентрации ИФН использовали коммерческие наборы реагентов иммуноферментного анализа (ИФА) производства фирмы VeriKine™ (США). ИФА проводили после двукратного разведения пулированной сыворотки, используя дилуенты, рекомендованные инструкциями фирмы-производителя наборов. Испытуемые образцы и разведенные стандарты вносили на пласку в дубликатах. Использован твердофазный иммуноферментный метод, где определяемое вещество является антигеном (АГ) с двумя участками связывания (эпитопами), а узнающими - два типа моноклональных антител (АТ) ("сэндвич"-метод). Один тип АТ иммобилизован на твердой фазе и связывает один эпитоп молекулы определяемого вещества, находящегося в жидкой фазе, второй тип АТ находится в конъюгате с биотином и связывает второй эпитоп молекулы определяемого вещества. Индикаторным компонентом является пероксидаза хрена, конъюгированная со стрептавидином. В определяющей системе был использован субстрат тетраметилбензидин (ТМБ). Измеряли активность связанной пероксидазы на анализаторе иммуноферментных реакций УНИПЛАН™ ("Picon") при длине волны 450 нм.

Группы контроля не показали различий в уровне ИФН до и после введения плацебо (физ. раствор). В образцах сыворотки крови, взятых для исследования через 24 ч после введения Арбидола было зафиксировано некоторое, хотя и недостоверное повышение уровня ИФН- α .

При этом группа, получавшая Даларгин, продемонстрировала значительное увеличение продукции ИФН- α как по сравнению с группами контроля, так и при сравнении с препаратом Арбидол ($p < 0,001$) (фиг. 1).

Пример 7. Оценка влияния Даларгина на функциональную активность натуральных киллеров (НК).

Естественные/натуральные киллеры - это большие гранулярные лимфоциты с фенотипом CD3⁺

CD16⁺CD56⁺, способные распознавать и убивать клетки-мишени без предварительной сенсibilизации, что особенно важно в реализации противоопухолевого иммунитета и при инфицировании внутриклеточными паразитами.

При оценке влияния Даларгина *in vitro* на функциональную активность НК в качестве источника этих клеток была также использована суспензия мононуклеарных клеток периферической крови здоровых доноров (n=20).

Функциональную активность НК определяли на основе цитотоксической реакции (НК способны лизировать клетки миелобластоидной и лимфобластоидных линий) с помощью радиометрического метода. Для этого на 2-й день после посева клетки миелобластоидной линии К-562 в концентрации 10⁶/мл инкубировали в течение 1 ч при 37°C вместе с 3Н-уридином в дозе 3 мКи/мл клеточной суспензии. Далее после инкубации трехкратно отмывали от радиометки в среде 199.

Цитотоксическую реакцию ставили в объеме 200 мкл в круглодонных 96-луночных планшетах. Для этого 100 мкл меченых клеток-мишеней и 100 мкл мононуклеаров (эффекторных клеток) периферической крови донора смешивали в соотношении 1:50 в триплетах на каждое разведение.

В одном случае после раскапывания эффекторных клеток и клеток-мишеней в планшеты вносили Даларгин в молярной концентрации 5×10⁻⁸ М (≈0,036 мкг/мл). В контрольные пробы препарат не вносили. Для определения с выхода метки к клеткам-мишеням добавляли равное количество тритона X-100. Далее планшеты отправляли на 24 ч в CO₂ инкубатор при 37°C, после чего содержимое переносили на стекловолокнистые фильтры, промывали, сушили, помещали во флаконы со сцинтилляционной жидкостью и определяли радиоактивность на счетчике бета-частиц. Индекс цитотоксичности (ИЦ) определяли по формуле: ИЦ=((А-В)/(С-В))×100%, где А - радиоактивность клеток-мишеней в присутствии клеток-эффекторов, В - остаточная радиоактивность после обработки клеток-мишеней тритоном X-100, С - радиоактивность в клетках-мишенях в отсутствие клеток-эффекторов.

Как показано на фиг. 2, результаты эксперимента свидетельствуют об иммуностропном потенциале Даларгина в отношении естественных киллеров.

Пример 8. Изучение влияния Даларгина на фагоцитоз.

В настоящее время Даларгин одобрен для медицинского применения у человека в интервале однократных доз 1-5 мг [20], что в перерасчете для мыши составит ≈0,2-1 мг/кг. Поэтому для исследования эффективности препарата в модели фагоцитоза перитонеального экссудата у мышей была принята доза 0,2 мг/кг. Также представляло интерес изучение возможного влияния пути введения препарата на функциональную активность фагоцитов.

Для изучения иммуномодулирующего действия препарата применяли микроскопический метод. Использовали 60 самцов мышей линии BALB/c массой 18-22 г. Животных распределили на 6 равных групп по 10 мышей в каждой. Две группы служили контролем. Группы активной терапии получали Даларгин в/м или интраназально в однократной дозе 0,2 мг/кг. На следующие сутки после введения исследуемых препаратов выполняли процедуры по извлечению макрофагов или нейтрофилов.

Для накопления нейтрофилов в качестве хемоаттрактанта мышам внутрибрюшинно вводили 3-4 мл 10% раствора пептона, после чего через 2 ч их подвергали эвтаназии с помощью хлороформа. Далее выполнялось вскрытие в асептических условиях. Из брюшной полости пастеровской пипеткой отсасывали жидкость, которую дальше помещали в пробирки и центрифугировали 10 мин при 1000 об/мин, после чего осадок снова разбавляли, достигая концентрации 2,5 млн/мл по нейтрофилам.

Для извлечения макрофагов мышей подвергали эвтаназии на 3-и сутки после введения пептона. Далее внутрибрюшинно вводили 3-4 мл среды 199 с 10% эмбриональной телячьей сывороткой и отсасывали эту жидкость.

Предварительно опсонизированные пуловой мышиною сывороткой (10 мин при температуре 37°C) бактерии *Staph. aureus* (штамм, не содержащий белка А) добавляли к суспензии фагоцитарных клеток в равном объеме в соотношении 10:1 (т.е. 25 млн. ед/мл). После инкубации готовили мазок (окраска по Романовскому-Гимзе).

Фагоцитарную активность нейтрофилов оценивали по показателям: фагоцитарный индекс и фагоцитарное число. Функциональную активность макрофагов оценивали микроскопически, а также по их способности поглощать нитро синий тетразолий (НСТ) в активированном состоянии.

Полученные результаты продемонстрировали способность Даларгина (0,2 мг/кг) увеличивать функциональную активность (фагоцитоз) мобилизованных пептоном нейтрофилов у мышей. При этом путь введения не показал различий в плане эффективности. Для макрофагов перитонеального экссудата также было выявлено стимулирующее влияние Даларгина на фагоцитоз с усилением их способности восстанавливать НСТ. Различий в зависимости от пути введения не обнаружено (табл. 4).

Таблица 4

Влияние Даларгина на фагоцитарную активность
нейтрофилов и макрофагов мышей

Нейтрофилы		
Группа	Фагоцитарный индекс	Фагоцитарное число
Контроль (n=10),	19,1 ± 0,45	2,25 ± 0,10
Даларгин (в/м 0,2 мг/кг, n=10)	32,43 ± 0,56*	3,01 ± 0,13*
Даларгин (и/н 0,2 мг/кг, n=10)	31,87 ± 0,43*	2,93 ± 0,15*
Макрофаги		
Группа	Фагоцитарный индекс	Фагоцитарная активность (%)
Контроль (n=10)	55,2 ± 4,6	10,3 ± 0,7
Даларгин (в/м 0,2 мг/кг, n=10)	67,7 ± 6,1*	19,8 ± 1,2*
Даларгин (и/н 0,2 мг/кг, n=10)	63,9 ± 5,7*	19,1 ± 1,1*

Примечание: *Уровень значимости $p < 0,05$ (при сравнении с группой контроля).

Таким образом, Даларгин оказывает стимулирующее влияние на фагоцитарное звено неспецифического иммунитета.

Пример 9. Исследование влияния Даларгина на продукцию провоспалительных цитокинов.

Оценка влияния Даларгина на синтез цитокинов ИЛ-1 (интерлейкин-1), ИЛ-6 (интерлейкин-6) и ФНО- α (фактор некроза опухоли-альфа) выполнялась в эксперименте *in vitro* с использованием культуры мононуклеаров периферической крови здоровых доноров (n=20). Для индукции провоспалительных цитокинов применяли стимуляцию полисахаридом энтеробактерий.

Для получения взвеси мононуклеаров кровь разводили 1:2 средой 199, наслаивали на градиент фико-колла-пака, $d=1,077$ г/см³ и центрифугировали при 400×g в течение 40 мин. Белое кольцо, образующееся на разделе фаз и содержащее мононуклеары, аккуратно отсасывали пипеткой Пастера и 2 раза отмывали средой 199 с помощью 10-минутного центрифугирования (200×g). Осадок ресуспендировали в питательной среде, считали в камере Горяева и доводили до нужной концентрации.

В исследуемые образцы вместе с полисахаридом к суспензии мононуклеаров добавляли Даларгин в молярной концентрации 5×10^{-8} М ($\approx 0,036$ мкг/мл). В контрольные пробы препарат не вносили.

Количественное определение цитокинов в сыворотке крови выполняли с помощью двуцентрового иммуноферментного анализа.

Результаты, представленные на фиг. 3, демонстрируют значимое подавление Даларгином индуцированной липополисахаридом продукции ИЛ-6, ИЛ-1 и ФНО- α . Степень продукции провоспалительных цитокинов представлена как отношение к их содержанию в контрольных пробах, принятому за 100%.

Таким образом, необходимо отметить, что исследуемый гексапептид обладает противовирусными и иммуномодулирующими свойствами. Регулирует активность клеток врожденного и адаптивного иммунитета. Даларгин усиливает активность фагоцитарного звена иммунитета (макрофагов и нейтрофилов), а также активность лимфоцитов - естественных киллеров. Также препарат стимулирует выработку эндогенных интерферонов.

Кроме того, Даларгин, проявляя способность подавлять избыточный синтез провоспалительных цитокинов (ИЛ-1, ИЛ-6, ФНО- α), способен снижать степень интоксикации и купировать прочие проявления воспалительного каскада.

Таким образом, фармацевтическая композиция продемонстрировала противовирусную активность в эксперименте у мышей, получавших Даларгин интраназально в дозе 2 мг/кг в сутки, что соответствует дозе 10 мг в день для человека.

Объем раствора для однократного интраназального введения человеку составляет 1-2 капли в каждую ноздрю (суммарно 2-4 капли), что соответствует объему 0,1-0,2 мл.

На основе проведенных экспериментов можно заключить, что эквивалентная человеку концентрация фармацевтической композиции для интраназального введения составит 0,01-30 мг/мл (0,01-3% раствор Даларгина).

При этом при интраназальном введении композиция характеризуется противовирусными и иммуномодулирующими эффектами, сопоставимыми с внутримышечным введением, что особенно актуально для клинического применения.

Список литературы

- [1] Грипп и гриппоподобные инфекции (включая особо опасные формы гриппозной инфекции). Фундаментальные и прикладные аспекты изучения. Бюллетень проблемной комиссии. Под ред. В.И. Покровского, Д.К. Львова, О.И. Киселева, Ф.И. Ершова. СПб.: Роза мира, 2008.
- [2] Sullivan K.M., Monto A.S., Longini I.M. Estimates of the US health impact of influenza. *Am J Public Health*, 1993, 83: 1712-1716.
- [3] По данным отчетов Федерального государственного учреждения здравоохранения "Федеральный центр гигиены и эпидемиологии Роспотребнадзора РФ". Available at: <http://www.fcgsen.ru/>.
- [4] Turner R. Epidemiology, pathogenesis and treatment of the common cold. *Annals of allergy, asthma and immunology*, 1997, 78: 531-539.
- [5] Hayden F., Couch R. Clinical and epidemiological importance of influenza A viruses resistant to amantadine and rimantadine. *Reviews in Medical virology*, 1992, 2: 89-96.
- [6] Киселёв О.И., Деева Э.Г., Сологуб Т.В., Цветкова В.В. Рекомендации по лечению и профилактике гриппа у взрослых. ФГБУ "НИИ гриппа" Минздрава России. СПб., 2014, 4.
- [7] Селькова Е.П. Актуальные вопросы симптоматического и патогенетического лечения острых респираторных вирусных инфекций. Справочник поликлинического врача, 2013, 01:9-13.
- [8] Селькова Е.П. Новые технологии в профилактике и лечении острой респираторной вирусной инфекции. *Consilium medicum. Педиатрия*, 2007, 1:66-68.
- [9] Лазарева Н.Б., Журавлева М.В., Пантелеева Л.Р. ОРВИ: рациональная фармакотерапия с позиции клинической фармакологии // Медицинский совет. - 2016. - № 4.
- [10] Балачевский Б.В., Курганов А., Славинский А.А. Даларгин-индуцируемая модуляция функционально-метаболической активности нейтрофильных лейкоцитов // Успехи современного естествознания. - 2008. - № 5.
- [11] Зохилов А.Н. и др. Влияние синтетического аналога опиоидных пептидов даларгина на антиоксидантный статус собак // Вестник Курской государственной сельскохозяйственной академии. - 2016. - № 9.
- [12] Маслов Л.Н. и др. Кардиоваскулярные эффекты D-Ala², Leu⁵, Arg⁶-энкефалина (даларгин) связаны с активацией периферических опиоидных μ -рецепторов // Экспериментальная и клиническая фармакология. - 2008. - Т. 71. - № 2. - С. 21-28.
- [13] Gabrilovac, J., Ilic-Sutlic, M., Knezevic, N., & Poljak, L. (1996). Leu-enkephalin enhances interferon secretion in mice. *Research in experimental medicine*, 196(1), 137-144.
- [14] Чердаков В.Ю. и др. Применение регуляторных пептидов: тимогена, даларгина, глицил-гистидил-лизина и их комбинаций для коррекции нейтрофильного звена антиинфекционного иммунитета при переломе бедренной кости // Курский научно-практический вестник "Человек".
- [15] Земсков М.А. и др. Особенности иммунологических расстройств и их коррекции при инфекциях различного генеза // Вестник новых медицинских технологий. - 2011. - Т. 18. - № 3.
- [16] Чернышёва О.И., Бобынцев И.И. Биологические эффекты пептида GLY-HIS-LYS // Международный журнал прикладных и фундаментальных исследований. - 2014. - № 11-4. - С. 688-692.
- [17] Земскова, В.А., Земскова, С.С., Домнич, В.И., Шабунина, В.И. Механизмы действия дифференцированной иммунотерапии гнойно-воспалительных заболеваний различного генеза // Прикладные информационные аспекты медицины. - 2009. - Т. 12. - № 2. - С. 71-77.
- [18] Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств. Часть первая. - М.: Гриф и К, 2012. - 944 с.
- [19] Макаренко И.Е. и др. Возможные пути и объемы введения лекарственных средств лабораторным животным // Международный вестник ветеринарии. - 2013. - № 3. - С. 78-84.
- [20] Ершов Ф.И., Киселев О.И. Интерфероны и их индукторы (от молекул до лекарств). М.: ГЭО-ТАР - Медиа. - 2005. - 368 с.
- [21] Кузнецов В.П. Интерфероны в каскаде цитокинов: исторический и современный аспекты. // Антибиотики и химиотерапия. 1988. - Т.43. - № 5. - С. 28-40.
- [22] Инструкция по применению лекарственного препарата для медицинского применения Даларгин-Деко (ЛП-004596, интернет портал РГЛС <https://grls.rosminzdrav.ru/>, дата обращения 31.01.2018).

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Применение назальной композиции, содержащей гексапептид тирозил-D-аланил-глицил-фенилаланил-лейцил-аргинина или его фармацевтически приемлемую соль, для лечения острых респираторных вирусных заболеваний ОРВИ.
2. Применение по п.1, отличающееся тем, что таким заболеванием является грипп.
3. Применение по п.1, отличающееся тем, что фармацевтически приемлемой солью является тирозил-D-аланил-глицил-фенилаланил-лейцил-аргинина диацетат.
4. Применение по п.1, отличающееся тем, что назальная композиция изготовлена в виде спрея, содержащего в качестве активного вещества гексапептид тирозил-D-аланил-глицил-фенилаланил-лейцил-

аргинина или его фармацевтически приемлемую соль 0,01-3 мас.% и вспомогательные вещества - остальное.

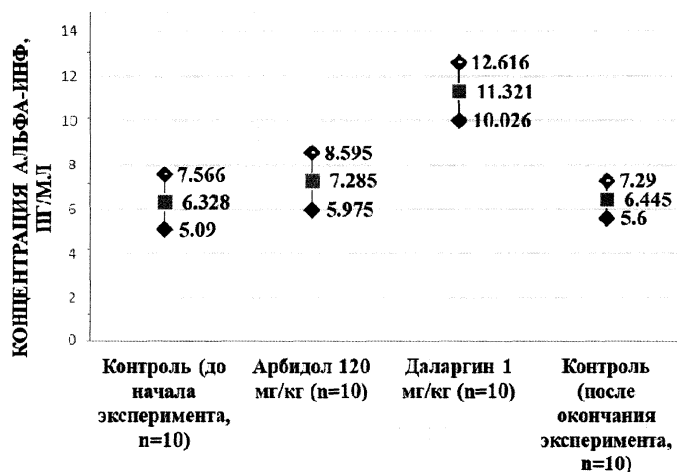
5. Применение по п.4, отличающееся тем, что композиция содержит гексапептид тирозил-D-аланил-глицил-фенилаланил-лейцил-аргинина или его фармацевтически приемлемую соль и вспомогательные вещества при следующем соотношении компонентов: гексапептид - 0,01-3 мас.%, вода - остальное.

6. Применение по п.4, отличающееся тем, что композиция содержит гексапептид тирозил-D-аланил-глицил-фенилаланил-лейцил-аргинина или его фармацевтически приемлемую соль и вспомогательные вещества при следующем соотношении компонентов, мас. %: гексапептид - 0,01-3, натрия хлорид - 7-11, вода - остальное.

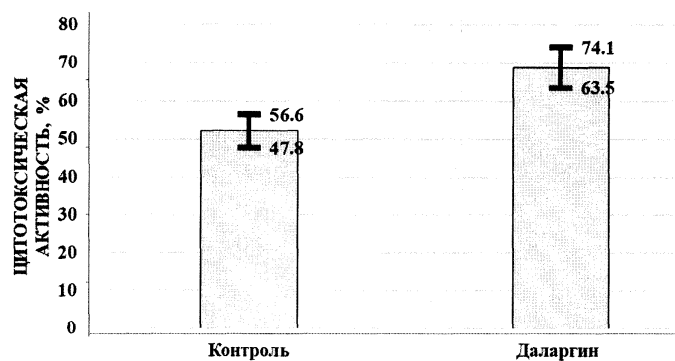
7. Применение по п.6, отличающееся тем, что композиция содержит гексапептид тирозил-D-аланил-глицил-фенилаланил-лейцил-аргинина или его фармацевтически приемлемую соль и вспомогательные вещества при следующем соотношении компонентов, мас. %: гексапептид - 0,01-3, натрия хлорид - 7-11, бензалкония хлорид - 0,1-0,2, вода - остальное.

8. Применение по п.6, отличающееся тем, что композиция содержит в качестве вспомогательных веществ натрия хлорид и воду при следующем соотношении компонентов, мас. %: натрия хлорид - 9, вода - 90.

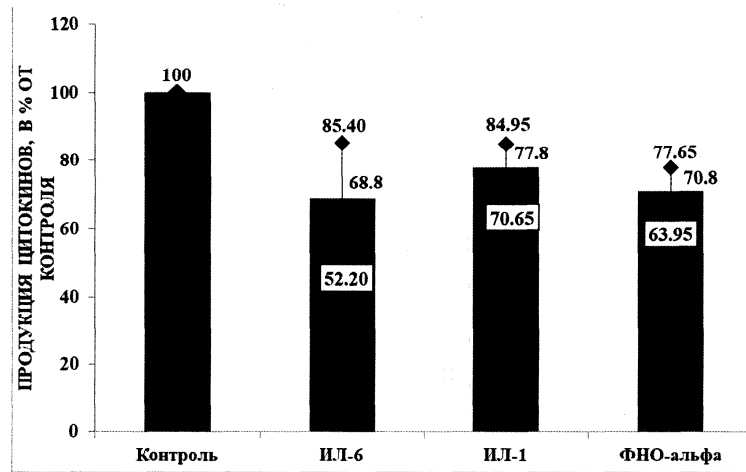
9. Применение по пп.5-8, отличающееся тем, что композиция содержит в качестве воды воду для инъекций или очищенную воду.



Фиг. 1



Фиг. 2



Фиг. 3

